

补肾活血中药对骨质疏松大鼠 Wnt 信号的影响

马威 潘静 胡必成 张瑶*

武汉市第一医院中心实验室,湖北 武汉 430022

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 07-0820-04

摘要: **目的** 探讨补肾活血方对卵巢摘除骨质疏松大鼠 Wnt 通路 β -Catenin mRNA 表达的影响。**方法** SPF 级 250 ± 20 g 雌性 SD 大鼠 40 只,随机分为假手术组(sham group)、模型组(model group)、雌激素药物治疗组(E group)、中药组(TCM group),每组 10 只。对假手术组大鼠施行假手术,其余 4 组行双侧卵巢摘除术,术后 30 天进行相应的给药实验,假手术组和模型组给予灌服等量的生理盐水。12 周后测定各组大鼠血清中 I 型胶原羧基端肽(β -Crosslaps)、I 型前胶原氨基端延长肽(PINP)含量;以双能 X 线骨密度测定仪测定大鼠的骨密度;用 RT-PCR 检测右侧股骨髓 LRP5、Wnt2、 β -Catenin mRNA 表达。**结果** model 组动物骨密度值(0.137 ± 0.013 g/cm²)、PINP 浓度(4.388 ± 0.400 ng/ml)、 β -Catenin mRNA 表达(1.05 ± 0.18)、LRP5 mRNA 表达(0.96 ± 0.24)、Wnt2 mRNA 表达(0.53 ± 0.11)。与模型组比较,sham 组及 TCM 组 BMD(0.168 ± 0.008 , 0.173 ± 0.008)显著增高($P < 0.05$),血清 β -Crosslaps(0.575 ± 0.068 , 0.618 ± 0.119)、LRP5 mRNA 表达(1.63 ± 0.51 , $2.630.22$)显著增高($P < 0.05$),sham、E、TCM 组 Wnt2mRNA 表达(1.03 ± 0.02 , 1.23 ± 0.12 , 1.58 ± 0.20)及 β -Catenin mRNA 表达(1.95 ± 0.16 , 1.62 ± 0.17 , 2.12 ± 0.20)显著增高($P < 0.05$);与 sham 组比较,TCM 组 β -Crosslaps、BMD(0.618 ± 0.119 , 0.173 ± 0.008)没有差异($P > 0.05$),PINP、Wnt2、LRP5 mRNA 表达(6.310 ± 0.990 , 1.58 ± 0.20 , 2.63 ± 0.22)显著增高($P < 0.05$);与 E 组比较,TCM 组 PINP、BMD、Wnt2、 β -catenin、LRP5 显著增高($P < 0.05$)。**结论** 补肾活血中药通过调节 Wnt 信号促进去卵巢术后骨质疏松大鼠成骨细胞增殖。

关键词: 骨质疏松;双侧卵巢摘除术;补肾活血中药;Wnt 信号; β -连接蛋白

Effect of enriching kidney and promoting blood flow TCM on Wnt signal in osteoporotic rats

MA Wei, PAN Jing, HU Bicheng, ZHANG Yao

The Central Lab of Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, China

Corresponding author: ZHANG Yao, Email: 799738065@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of traditional Chinese medicine (TCM) enriching kidney and promoting blood flow receipt on β -catenin mRNA in Wnt signal pathway in osteoporosis rat model. **Methods** Forty 250 ± 20 g female SPF grade SD rats were randomly divided into 4 groups: the sham operation group (sham group), the model group, the estradiol treatment group (E group), and the TCM enriching kidney and promoting blood flow treatment group (TCM group). Ten rats were in each group. Rats in the sham group were sham operated, and rats in the other groups were bilateral ovariectomized. The rats received corresponding treatment for 30 days after operation. After 12 weeks, bone mineral density (BMD) of all rats was measured using dual-energy X-ray absorptiometry. Serum concentration of type I collagen carboxy-terminal peptide (β -Crosslaps) and amino-terminal propeptide of type I procollagen (PINP) were determined. The expression of Wnt2, LRP5, and β -catenin in the right femoral bone marrow was measured. **Results** In the model group, BMD was 0.137 ± 0.013 g/cm², and serum concentration of PINP was 4.388 ± 0.400 ng/ml. The expression of β -Catenin mRNA, LRP5 mRNA, and Wnt2 mRNA was 1.05 ± 0.18 , 0.96 ± 0.24 , and 0.53 ± 0.11 , respectively. Compared to the model group, BMD in sham (0.168 ± 0.008) and TCM group (0.173 ± 0.008) increased significantly ($P < 0.05$), and β -Crosslaps (0.575 ± 0.068 , 0.618 ± 0.119) and the expression of LRP5 mRNA (1.63 ± 0.51 , 2.63 ± 0.22) increased significantly ($P < 0.05$). The expression of Wnt2 mRNA and β -Catenin mRNA in sham, E, and TCM group increased obviously compared to the model group. PINP and the expression of Wnt2 and LRP5 mRNA in TCM group increased significantly compared to the sham group ($P < 0.05$), but β -Crosslaps and BMD between TCM and the sham group

were no difference. Compared to E group, PINP, BMD, Wnt2, β -catenin, and LRP5 in TCM group increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** TCM enriching kidney and promoting blood flow promotes osteoblast proliferation by regulating Wnt signal in ovariectomized osteoporotic rats.

Key words: Osteoporosis; Ovariectomy; Traditional Chinese medicine enriching kidney and promoting blood flow; Wnt signal pathway; β -catenin

骨质疏松症是以骨量减少、骨的微观结构退化,导致骨的脆性增加而易发生骨折、骨痛的一种代谢性疾病。有研究表明,到 2050 年我国骨质疏松患者(包括骨量减少)将增加到两亿一千二百万,占总人口 13.2%^[1]。绝经后骨质疏松症与雌激素含量低下关系密切,又称为 I 型骨质疏松症,雌激素的治疗能明显改善症状,但长期服用后患静脉血栓、冠心病、乳腺癌等疾病风险增加^[2],骨质疏松及其并发症将成为全球性公共健康问题。近年的研究显示中医药在防治骨质疏松上有明显优势,本文就补肾活血中药对切除卵巢后骨质疏松大鼠 Wnt 信号改变进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 40 只,SPF 级,250 $\pm$ 20 g,由湖北省实验动物研究中心提供,动物合格证编号:No. 42000600000069。动物饲养于武汉市第一医院动物室内(SYXK(鄂)2008-0030),湖北省动物设施使用证编号:No. 00115584。大鼠维持饲料购于北京华阜康公司,并预先经辐照消毒处理。动物 4 只/笼,自由饮去离子水。

1.2 实验药品与仪器试剂

1.2.1 实验药物:阳性对照药物戊酸雌二醇片(生产企业:DELPHARM Lille S. A. S. 批号:253A),配制成 0.02 mg/ml 水溶液。补肾活血方由鹿角胶 15 g、巴戟天 9 g、熟地 9 g、续断 9 g、丹参 9 g、党参 9 g 组成。药材购于湖北天济中药饮片有限公司,鹿角胶烊化后,合并其他药物煎煮液,浓缩至 1 g 生药/ml 溶液,冷藏备用。

1.2.2 仪器试剂:罗氏 C601 电化学发光仪用于检测 β -Crosslaps 及 PINP,试剂购自罗氏公司,批号分别为 00172416 和 00172419。Beckman coulter AU2700 全自动生化分析仪用于检测生化指标;双能 X 线吸收测量仪用于骨密度检测。引物合成于上海生工公司,PCR 试剂源于 Fermentas 公司。

1.3 动物造模^[3]

上述动物随机分为 2 组,假手术组 10 只,造模

组 40 只。将动物以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后,仰卧于手术台上,四肢固定,腹部正中偏下处备皮,活力碘消毒,于腹正中中线切开皮肤,依次分开肌肉、腹膜,进入腹腔分离出被脂肪组织包裹的略带粉红色的“桑椹样”卵巢组织,丝线结扎后剪去卵巢,为造模组。假手术组(Sham operation group, Sham group)分离出卵巢组织后仅切除少量脂肪。逐层缝合,活力碘消毒。待麻醉苏醒后常规饲养,并连续注射青霉素 3 天。

1.4 给药方法

在动物接受造模处理后第 31 天,进行药物治疗。将造模组动物随机分为 3 组,每组 10 只,即模型组(Model group)、中药组(TCM group)、雌激素药物对照组(Estradiol valerate control group, E group)。中药组及雌激素药物对照组各自按 1 ml/100 g 体重给予相应的药物灌胃,假手术组和模型组按相同剂量灌服生理盐水。连续给药 12 周。

1.5 指标检测

1.5.1 骨密度检测:治疗后第 12 周进行检测,将各组大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,四肢展开平置于双能 X 线吸收测量仪平台上,通过计算机系统中小动物软件测定全身 BMD。由华中科技大学附属协和医院核医学科检测。

1.5.2 取材及检测:动物 10% 水合氯醛麻醉后,腹主动脉采血,分离血清备用;采血后,沿侧胸壁打开胸腔,暴露心脏,将灌注针从心尖经左心室插入升主动脉,剪开右心耳,注入生理盐水 300ml,直至流出清亮液体为止。取左侧股骨骨髓, -80℃ 冰箱保存备用。

1.5.3 骨代谢指标检测:血清 β 胶原特殊序列(β -Crosslaps)、血清 I 型前胶原氨基端延长肽(Procollagen Type I amino-terminal Propeptide, PINP)含量由武汉市第一医院检验中心检测。

1.5.4 Wnt2、LRP5 及 β -catenin mRNA 的 RT-PCR 检测:参照 Trizol 说明书提取各组大鼠右侧股骨骨髓的总 RNA,再以 β -actin 作为内参,进行 RT-PCR。 β -catenin 上游引物:5'-GGAAAGCA AGCTCATCATTCT-3',下游引物:5'-AGTGCCTGCATCCCACCA-3',引物长度 171bp,退火温度 55℃;LRP5 上游引物:5'-

TTTACGCTG CGATGCTGTCT-3',下游引物:5'-ACACGCTGGCA GACAAAGTA-3',长度 243bp,退火温度 60℃;β-actin 上游引物:5'-GCCAACACAGTGCTGTCT-3',下游引物:5'-AGGAGCAATGATCTTGATCTT-3',引物长度 114bp,退火温度 55℃;Wnt2 上游引物:5'-TCAGGAAAACAGGCGACTATCTC-3',下游引物:5'-GCCTCTCCCACAACACATAACTT-3',产物长度 257bp,退火温度 60℃。35 个循环后,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪采集电泳图像并分析各组条带灰度,并以 β-actin 为参照,计算各指标相对含量。

1.6 统计分析

统计处理用 SPSS 18.0 软件,实验数据以($\bar{x} \pm SD$)表示,正态分布定量数据多组间均值比较采用

单因素方差分析,多组间两两比较用 LSD 法,方差齐性检验用 Levene 法,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为有非常显著差异。

2 结果

2.1 骨密度分析

各组动物骨密度数据经 K-S 检验提示符合正态分布,经 ANOVA 方差分析提示总体有差异($P < 0.05$),以 LSD 法进行多组间两两比较,结果如表 1 所示,与模型组比较,Sham、TCM 组骨密度显著增高($P = 0.000, 0.000$);与 E 组比较,TCM 组 BMD 显著增高($P = 0.000$)。

表 1 各组动物 BMD、β-Crosslaps、P1NP 比较 ($\bar{x} \pm SD$)

Group	N	β-Crosslaps	P1NP	BMD
Model group	10	0.745 ± 0.075	4.388 ± 0.400	0.137 ± 0.013
Sham group	10	0.575 ± 0.069 ^b	4.956 ± 0.696	0.168 ± 0.008 ^b
E group	10	0.649 ± 0.052 ^a	5.516 ± 0.351 ^b	0.146 ± 0.006 ^d
TCM group	10	0.618 ± 0.119 ^a	6.310 ± 0.990 ^{bde}	0.173 ± 0.008 ^{bf}
F value(<i>P</i>)		7.535 (0.001)	12.310 (0.000)	29.559 (0.000)

与模型组比较,a; $P < 0.05$,b; $P < 0.01$;与假手术组比较,c; $P < 0.05$,d; $P < 0.01$;与雌激素药物对照组比较,e; $P < 0.05$,f; $P < 0.01$ 。

2.2 血清 β-Crosslaps、P1NP 含量比较

各组动物 β-Crosslaps、P1NP 数据经 K-S 检验提示符合正态分布,经 ANOVA 方差分析提示总体有差异($P < 0.05$),以 LSD 法进行多组间两两比较,结果如表 1 所示,与模型组比较,Sham、E、TCM 组 β-Crosslaps 含量均显著降低($P = 0.000, 0.027, 0.000$),E、TCM 组 P1NP 含量均显著增高($P = 0.002, 0.000$);与假手术组比较,TCM 组 P1NP 含量显著增高($P = 0.000$);与 E 组比较,TCM 组 P1NP 显著增高($P = 0.023$)。

2.3 股骨髓 LRP5、β-catenin mRNA 表达比较

各组动物 LRP5、β-catenin mRNA 数据经 K-S 检验提示符合正态分布,经 ANOVA 方差分析提示总体有差异($P < 0.05$),以 LSD 法进行多组间两两比

较,结果如表 2 所示,与模型组比较,Sham、E、TCM 组 Wnt2、β-catenin mRNA 表达显著增高($P = 0.000$),Sham、TCM 组 LRP5 mRNA 表达显著增高($P = 0.001, 0.000$);与 Sham 组比较,E、TCM 组 Wnt2 mRNA 显著增高($P = 0.023, 0.000$),E 组 β-catenin mRNA 表达显著降低($P = 0.000$),TCM 组 β-catenin 没有差异($P = 0.069$),TCM 组 LRP5 mRNA 表达显著增高($P = 0.000$);与 E 组比较,TCM 组 β-catenin、LRP5、Wnt2 mRNA 表达显著增高($P = 0.000, 0.000, 0.000$)。

3 讨论

骨质疏松症在传统医学中归于“骨萎”、“骨痹”范畴,普遍认为肾虚为本病之本。中医认为肾为先

表 2 各组动物股骨髓 β-catenin、LRP5 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm SD$)

Group	N	Wnt2	β-catenin	LRP5
Model group	8	0.53 ± 0.11	1.05 ± 0.18	0.96 ± 0.24
Sham group	8	1.03 ± 0.20 ^b	1.95 ± 0.16 ^b	1.63 ± 0.51 ^b
E group	8	1.23 ± 0.12 ^{bc}	1.62 ± 0.17 ^{bd}	1.14 ± 0.23 ^d
TCM group	8	1.58 ± 0.20 ^{bdf}	2.12 ± 0.20 ^{bf}	2.63 ± 0.22 ^{bdf}
F Value(<i>P</i>)		58.245 (0.000)	55.741 (0.000)	42.072 (0.000)

与模型组比较,a; $P < 0.05$,b; $P < 0.01$;与假手术组比较,c; $P < 0.05$,d; $P < 0.01$;与雌激素药物对照组比较,e; $P < 0.05$,f; $P < 0.01$ 。

天之本,主藏精生髓养骨。肾精的盛衰影响骨的生长、发育、衰弱过程。胎中失养,孕育不足,体质虚弱而肾气亏虚,肾虚致精亏,精亏致髓失所养,最终髓空骨软。瘀血阻滞经络血脉,使气血不能滋养骨骼,最终发为骨菱,瘀血致病是近代中医对骨质疏松症的新认识^[4-5]。本方鹿角胶温补肝肾,益精养血为君药,巴戟天、续断补肾阳,强筋骨,熟地养阴填精益髓,党参健脾益气,补中生津,丹参活血祛瘀生新,诸药合用,共奏补肾益精,益气活血之功。

β -Crosslaps 和 P1NP 是国际骨质疏松症基金会 (IOF) 推荐使用的用于评价骨形成和骨转换的骨标志物。骨基质的有机成分中,骨胶原的含量约占 90%,成骨细胞先合成 I 型前胶原,继而后者形成骨胶原。I 型前胶原在氨基端和羧基端均存在延长肽链,在形成骨胶原时,这些肽链将被特异性蛋白酶剪切下来,成熟的胶原组织沉积于骨基质,而 P1NP 通过细胞间隙进入血液,为 I 型胶原降解后释放入血液的片段。本研究显示,TCM 组血清中胶原降解片段 β -Crosslaps 含量显著低于 Model 组 ($P < 0.05$),略高于 sham 组 ($P > 0.05$),同时血清中反应 I 型胶原合成的 P1NP 含量显著高于 Model 组 ($P < 0.01$),而 TCM 组 P1NP 含量高于 sham 组,说明补肾活血中药对 OP 大鼠骨形成和骨转换均有促进作用,而促进骨形成的作用更为显著,TCM 股骨骨密度显著增高 ($P < 0.01$) 也佐证了此观点。

Wnts 蛋白是一类富含半胱氨酸的分泌性糖基蛋白,对组织发生发展和保持自我更新稳态平衡起重要作用,可在多种细胞表达。目前已经了解的 Wnt/ β -catenin 经典通路作用机制为:Wnt 蛋白与细胞膜受体卷曲蛋白 (Fz) 和辅助受体脂蛋白受体相关蛋白 5/6 (LRP5/6) 结合,活化 Fz 受体,通过骨架蛋白 (Dv) 等与糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 组成的复合物,使得 β -catenin 不能被磷酸化而降解,并在胞浆中聚积、转位入核,再与转录因子 T 细胞因子/淋巴细胞增强因子 (TCF/LEF) 结合启动靶基因转录,促进细胞的增殖或活化^[6]。该过程对骨形成非常关键,当 Wnt/ β -catenin 通路信号传导发生紊乱时,产生许多骨骼性或非骨骼性的疾病^[7]。另外过表达的经典 Wnt 信号通路配体如 Wnt1, Wnt2 等,可以发挥促进间质干细胞向成骨细胞分化的作用^[8],脂肪组织 Wnt10 过表达的转基因动物骨强度和骨量增加,其原理与拮抗衰老或荷尔蒙引起的骨丢失有关^[9]。LRP5 是一种细胞膜表面蛋白,属于低密度脂蛋白受体超家族。对骨组织而言,LRP5 一方面与

Wnt、Fz 结合形成复合物而进一步引发 Wnt-catenin 经典信号,引起下游一系列级联反应,促进成骨细胞增殖和正常骨骼发育,另一方面,DKK1 可通过与 LRP5 结合,将其从细胞膜上除去,进而抑制 Wnt 信号通路,使得 Wnt/LRP5/ β -Catenin 信号诱导成骨发生的过程终止^[10-11]。

本研究显示,TCM 组 Wnt2、LRP5 及 β -Catenin mRNA 表达均较 Model 组显著增加 ($P < 0.01$),股骨骨密度也显著增加 ($P < 0.05$),说明补肾活血中药可能通过 Wnt 经典信号通路,增高 OP 大鼠 Wnt2、LRP5 表达,活化 Fz 受体,使得 β -catenin 聚积增加,启动下游靶基因转录,促进去卵巢术后骨质疏松大鼠成骨细胞增殖,从而达到防治骨质疏松的目的。但骨质疏松是一个复杂的病理过程,与多条信号通路有关(如 PTH 通路、RANK/RANKL/OPG 通路等),且这些通路之间又有关联之处,补肾活血中药在防治骨质疏松过程中是否与这些信号有关,其间有何联系尚不清楚,需要进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Zhang SW, Li SH, Fan CH. Advance of TCM syndrome differentiation and treatment in primary osteoporosis. Chinese Journal of Osteoporosis. 2013, 19(12):1318-1322.
- [2] Sun K, Liu HL, Jin SH. New Progress of primary osteoporosis. Chinese Journal of Clinical Ration. 2014, 7(6A):194-195
- [3] Zhu L, Zhao XY, Qiu X. Relationship between Changes of Bone Mineral Density and Bone Marrow Pathology in Ovariectomized Rats. Chinese Journal of Experimental Hematology. 2014, 22(3):617-622.
- [4] Fang J, Yang L, Shen JZ, et al. Effect of Total Flavonoids of Rhizome on the Expression of Glu, mGluR5 and EAAT1 in Bone tissues of Ovariectomized Osteoporotic Rats. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics. 2014, 34(2):10-13.
- [5] Li AM, Gao P. A Review on Treating Primary Osteoporosis in TCM. TCM clinical Research. 2013, 5(17):117-119
- [6] Montagnani A. Bone anabolics in osteoporosis: Actuality and perspectives. World J Orthop. 2014, 18;5(3):247-254.
- [7] Glaas DN, Karsenty G. In vivo analysis of Wnt signaling in bone. Endocrinology, 2007, 148(6):2630-2634.
- [8] Kennell JA, Machougal OA. Wnt signaling inhibits adipogenesis through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. J Biol Chem 2005, 280(25):24004-24010.
- [9] Longo KA, Wright WS, Kang S, et al. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. J Biol Chem. 2004, 279(34):35503-35509.
- [10] Chang MK, Kramer I, Keller H, et al. Reversing LRP5 - dependent osteoporosis and SOST deficiency-induced sclerosing bone disorders by altering WNT signaling activity. J Bone Miner Res. 2014, 29(1):29-42.
- [11] Astrid L, Viktoria R, Thorsten S, et al. Osteoblast-Specific *Krm2* Overexpression and *Lrp5* Deficiency Have Different Effects on Fracture Healing in Mice. PLoS One. 2014, 9(7):e103250.

(收稿日期:2014-09-02)